

24.11.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日      2004年 9月 7日  
Date of Application:

出願番号      特願2004-259157  
Application Number:

[ST. 10/C] : [JP2004-259157]

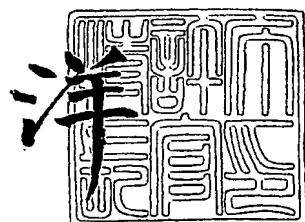
出願人      中外製薬株式会社  
Applicant(s):



2005年 1月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2004-3120465

**【書類名】** 特許願  
**【整理番号】** 041908  
**【提出日】** 平成16年 9月 7日  
**【あて先】** 特許庁長官 殿  
**【国際特許分類】** A61K  
**【発明者】**  
 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
 【氏名】 八杉 健司  
**【発明者】**  
 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
 【氏名】 中村 輝郎  
**【発明者】**  
 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
 【氏名】 下房地 剛  
**【特許出願人】**  
 【識別番号】 000003311  
 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社  
**【代理人】**  
 【識別番号】 100089705  
 【弁理士】  
 【氏名又は名称】 杜本 一夫  
**【選任した代理人】**  
 【識別番号】 100076691  
 【弁理士】  
 【氏名又は名称】 増井 忠式  
**【選任した代理人】**  
 【識別番号】 100075270  
 【弁理士】  
 【氏名又は名称】 小林 泰  
**【選任した代理人】**  
 【識別番号】 100080137  
 【弁理士】  
 【氏名又は名称】 千葉 昭男  
**【選任した代理人】**  
 【識別番号】 100096013  
 【弁理士】  
 【氏名又は名称】 富田 博行  
**【選任した代理人】**  
 【識別番号】 100122644  
 【弁理士】  
 【氏名又は名称】 寺地 拓己  
 【電話番号】 03-3270-6641  
 【ファクシミリ番号】 03-3246-0233  
 【連絡先】 担当  
**【手数料の表示】**  
 【予納台帳番号】 051806  
 【納付金額】 16,000円  
**【提出物件の目録】**  
 【物件名】 特許請求の範囲 1  
 【物件名】 明細書 1

特願 2004-259157

ページ： 2/E

【物件名】

図面 1

【物件名】

要約書 1

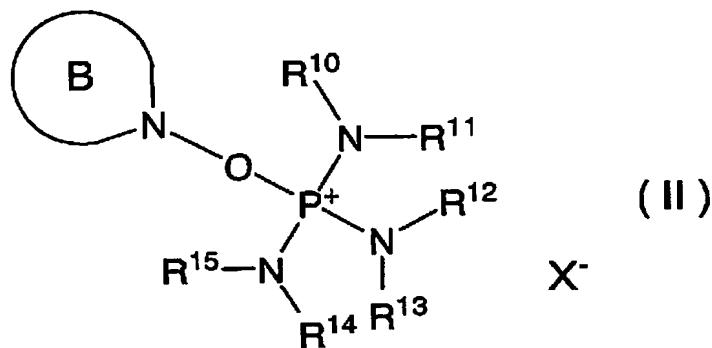
出証特 2004-3120465

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

非プロトン性極性溶媒中で、式（II）：

【化1】



[式中、R<sup>1~0</sup>、R<sup>1~1</sup>、R<sup>1~2</sup>、R<sup>1~3</sup>、R<sup>1~4</sup>およびR<sup>1~5</sup>は、それぞれ独立にC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基から選択され、またはR<sup>1~0</sup>およびR<sup>1~1</sup>、R<sup>1~2</sup>およびR<sup>1~3</sup>、ならびにR<sup>1~4</sup>およびR<sup>1~5</sup>は、それぞれ独立にそれらが結合する窒素原子と一緒にになって含窒素ヘテロ環を形成してもよく、環Bは置換されていてもよい単環式または縮環式の含窒素ヘテロ環基であり、X<sup>-</sup>はアニオンを表す]

で表される縮合剤を使用して、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸部分に含まれるカルボキシル基を、30モル%以上の修飾率で置換アミド基に変換する工程を含む、水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

【請求項 2】

カルボキシル基の変換により生じる置換アミド基の置換基が、少なくとも1以上の官能基を含み、当該官能基が、置換されていてもよいアミノ基、ヒドロキシル基、メルカプト基、カルボキシル基、アルデヒド基、メタクリロイル基、およびアクリロイル基から選択される、請求項1に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

【請求項 3】

カルボキシル基の変換により生じる置換アミド基の置換基が、置換されていてもよいアミノ基、ヒドロキシル基、メルカプト基、カルボキシル基、アルデヒド基、メタクリロイル基、およびアクリロイル基から選択される1つの官能基を含む、請求項1に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

【請求項 4】

カルボキシル基の変換により生じる置換アミド基の置換基が、置換されていてもよいアミノ基を含む、請求項1~3のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

【請求項 5】

カルボキシル基の変換により生じる置換アミド基の置換基が、アミノアルキル基またはアミノ(ポリアルキレンオキシ)基である、請求項4に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

【請求項 6】

ヒアルロン酸またはその誘導体と反応させる化合物が、式：

H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NH<sub>2</sub>；または

H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>

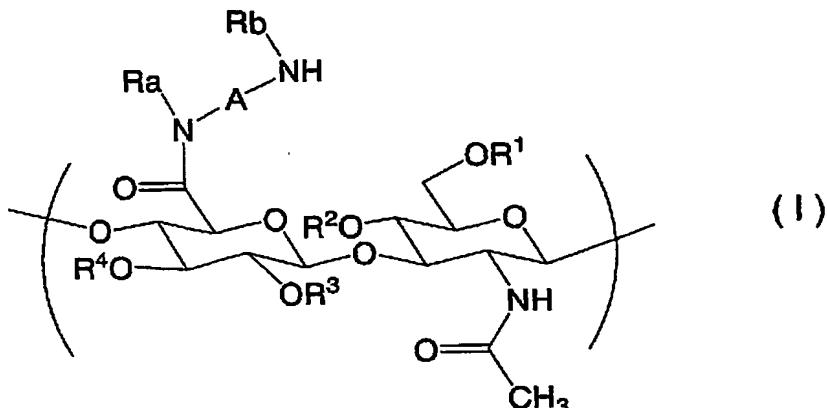
[式中、mは2~10から選択される整数であり、nは1~10から選択される整数である]

で表される、請求項5に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

【請求項 7】

前記水溶性ヒアルロン酸修飾物が式(I)：

## 【化2】



[式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、それぞれ独立に、水素原子、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル基またはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルカルボニル基から選択され、

R<sub>a</sub>およびR<sub>b</sub>は、それぞれ独立に、水素原子またはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル基から選択され

、Aは、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-または-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-であり

、mは2～10から選択される整数であり、nは1～10から選択される整数である]で表される繰り返し単位を分子内に少なくとも1以上含むものである、請求項1～6のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

## 【請求項8】

前記水溶性ヒアルロン酸修飾物が薬物担体として使用される、請求項1～7のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

## 【請求項9】

前記水溶性ヒアルロン酸修飾物が、ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有するものである、請求項1～8のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

## 【請求項10】

前記水溶性ヒアルロン酸誘導体の哺乳動物における平均血中滞留時間が18時間以上である、請求項1～9のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

## 【請求項11】

非プロトン性極性溶媒が、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルアセトアミド(DMAc)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン(DMI)、スルホラン(SF)、N-メチルピロリドン(NMP)またはこれらの2種以上の混合溶媒から選択される請求項1～10のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

## 【請求項12】

非プロトン性極性溶媒がジメチルスルホキシド(DMSO)である、請求項11に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

## 【請求項13】

式(I)において、環Bがベンゾトリアゾール-1-イルである、請求項1～12のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

## 【請求項14】

前記縮合剤が、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(BOP)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ピロリジノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)、およびこれらの混合物から選択されるBOP系縮合剤である、請求項1～13のいずれか1項に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

**【請求項15】**

請求項1～14のいずれか1項に記載の製造方法により得られる水溶性ヒアルロン酸修飾物。

**【請求項16】**

請求項15の記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む薬物担体。

**【請求項17】**

請求項15の記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物により表面修飾された微粒子薬物担体。

**【請求項18】**

請求項15の記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む医薬組成物。

**【請求項19】**

請求項15の記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物と薬物とからなる水溶性ヒアルロン酸修飾物—薬物コンジュゲート。

**【請求項20】**

請求項15に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む、治療用あるいは診断用の医療用デバイス。

**【請求項21】**

請求項15に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物で表面修飾を施した、請求項20の医療用デバイス。

【書類名】明細書

【発明の名称】水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬物担体として有用な水溶性ヒアルロン酸修飾物、およびその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

一般に、低分子薬物、ペプチド薬物、タンパク質薬物等の血中滞留性の向上、安定性の向上、溶解性の向上、抗原性の低減等を目的として、薬物と水溶性ポリマーとのコンジュゲーションが試みられている。特に、ポリエチレングリコール（以下、PEGとも称す）は、その不活性な性質と生体内でのタンパク質による薬物の吸着を防ぐ効果を有することから広く用いられており、PEGコンジュゲート化タンパク質は医薬品として既に実用化の段階に入っている。しかし、PEGは生分解性ポリマーではない為、長期投与により体内に蓄積した場合の安全性等の問題は明らかでない。更には、最近、PEGコンジュゲート化リポソームにおいて投与2回目のクリアランスが異常に早い現象（Accerelated Blood Clearance現象、以下ABC現象とも称す）が報告されており（非特許文献1および2を参照）、PEGコンジュゲート化医薬品の安全性、有効性は十分に確立されたとは言い難い。

【0003】

一方、ヒアルロン酸（以下、HAとも称す）は、1934年、K. Meyerによって牛の眼の硝子体から単離された多糖であり、細胞外マトリックスの主成分として古くから知られている。ヒアルロン酸は、その化学的および物理的構造に種差が無く、ヒトにおいてもヒアルロン酸の代謝系が存在する。さらに免疫性または毒性の点に関しても最も安全な生体材料（Biomaterial）ということができる。近年、細胞の接着、増殖、移動の誘導に関するヒアルロン酸の生理活性物質としての側面が報告され注目されてきている。また、微生物による高分子量のヒアルロン酸の大量生産が可能となり、関節疾患治療薬などの医薬として実用化されており、化粧品等の分野においても実用化が進んでいる。さらに、薬物をヒアルロン酸とコンジュゲートすることで、薬物の癌組織へのターゲティング（特許文献1を参照）、肝臓へのターゲティング（特許文献2を参照）、抗原性の低減（特許文献3を参照）、血中滞留時間の延長（特許文献4、5および6を参照）等が達成できるという報告がなされている。

【0004】

汎用されているPEGと比べて、薬物のコンジュゲート担体としてヒアルロン酸を用いる際の利点は、生分解性を有する点、巨大サイズ化が可能な点、さらに、1分子中に多くの反応点を持つため、複数の薬物（同一薬物を複数、或いは2種類以上の薬物）を1分子中に担持できるということである。このような利点を有するヒアルロン酸を薬物コンジュゲート担体として用いることは、ターゲティング、徐放等、より高度な薬物動態制御機能を持つコンジュゲートを設計開発の手段となる。また、ヒアルロン酸は生分解性である上に、その化学的構造に種差が無いことから、安全性という点においてもPEGよりも優れた担体であるといえる。

【0005】

一方で、ヒアルロン酸自体の血中滞留時間は短く、静脈内注射（以下、ivとも称す）で半減期が2分であると報告されている（非特許文献3を参照）。本発明者の検討においても、ただ単にヒアルロン酸を薬物にコンジュゲートしただけでは、薬物の血中滞留時間の大きな延長や、薬効の持続性の向上は確認されなかった。

【0006】

ヒアルロン酸の主代謝部位は肝臓およびリンパ腺であり、その代謝は、主にCD44、RHAMM、HARE等のヒアルロン酸に特異的に結合する細胞膜局在レセプターを介した細胞内への取り込みとそれに引き続くヒアルロニダーゼによる分解によるものである。

これらの分子は共に、ヒアルロン酸の連続した遊離のカルボキシル基（6糖）を主な認識部位にしていることが報告されている（非特許文献4を参照）。

#### 【0007】

従って、血中滞留時間が短いというヒアルロン酸の問題を克服すべく、ヒアルロン酸に置換基を導入したヒアルロン酸修飾物を薬物担体として利用する試みもある（特許文献4、5および6を参照）。一般に、ヒアルロン酸に置換基を導入すればその血中滞留時間は延長され、その程度は置換基の導入率と相関すると考えられる。ヒアルロン酸の様々な位置に置換基が導入されたヒアルロン酸修飾物が報告されているが、その中でも、ヒアルロン酸におけるグルクロン酸部分のカルボキシル基に加水分解速度の遅いアミド結合を介して置換基を導入することが、得られるヒアルロン酸修飾物とヒアルロン酸レセプターとの結合阻害に最も効果があると考えられる。したがって、当該ヒアルロン酸修飾物は血中滞留時間の面から優れていると考えられる。しかしながら、本発明者の検討では、このようなヒアルロン酸修飾物を合成するに際し、一般的にヒアルロン酸修飾物の合成において汎用されている方法に従って、水中での脱水縮合反応によりヒアルロン酸に置換基を導入した場合、ヒアルロン酸のカルボキシル基の修飾率は最大でも約70モル%程度である上、このヒアルロン酸のカルボキシル基を最大限修飾したヒアルロン酸修飾物であっても実用的な薬物担体としては不十分なものであった。例えば、薬物担体としては大きな分子量を有するヒアルロン酸（分子量60万ダルトン）を用い、そのカルボキシル基の73モル%を修飾したヒアルロン酸修飾物であっても、ラットにおける平均血中滞留時間（MRT）は16時間程度でしかなく、実用的な薬物担体としては不十分であった。

#### 【0008】

一方、ヒアルロン酸をテトラブチルアンモニウム塩にし、DMSO中で置換基と反応させることによって、ヒアルロン酸のカルボキシル基をアミド化したヒアルロン酸修飾物（特許文献7を参照）も報告されているが、この発明は架橋体調製を目的としたもので、血中滞留性延長を目指したものではない。さらに言えば、この発明においては縮合剤として1,1-カルボニルジイミダゾール（CDI）を用いている。我々の検討では、縮合剤としてCDIを用いても血中滞留性が充分に延長された（ヒアルロニダーゼによる分解に対して充分な耐性を持つような）ヒアルロン酸誘導体を得ることはできず、さらに、反応中にヒアルロン酸分子量が大きく低下することが確認されている。

#### 【0009】

これら以外にも、水と極性有機溶媒の混合溶媒中で、ヒアルロン酸のカルボキシル基に置換基を導入した例も報告されている（特許文献8を参照）。しかしながら、得られたヒアルロン酸修飾物について、血中滞留時間の延長が見られるかどうかについては一切触れられておらず、また、この発明においては置換基の導入率は10%以下であり、この程度の置換基の導入率では血中滞留時間の延長された実用的な薬物担体を得ることはできない。

#### 【0010】

このように、薬物担体として実用的な水溶性ヒアルロン酸修飾物、特に血中滞留時間を実用的なレベルまで延長した水溶性ヒアルロン酸修飾物は知られておらず、その製造方法も知られていなかった。

【特許文献1】国際公開WO92/06714号パンフレット

【特許文献2】特開2001-81103号公報

【特許文献3】特開平2-273176号公報

【特許文献4】特開平5-85942号公報

【特許文献5】国際公開WO01/05434号パンフレット

【特許文献6】国際公開WO01/60412号パンフレット

【特許文献7】特表2002-519481号公報

【特許文献8】国際公開WO94/19376号パンフレット

【非特許文献1】Int. J. Pharm. 第255巻、第167-174頁、2003年

【非特許文献2】 J. Control. Rel. 第88巻、第35-42頁、2003年

【非特許文献3】 J. Inter. Med. 第242巻、第27-33頁、1997年

【非特許文献4】 Exp. Cell Res. 第228巻、第216-228頁、1996年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

発明が解決しようとする課題は、薬物担体として実用的な水溶性ヒアルロン酸修飾物、およびその製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

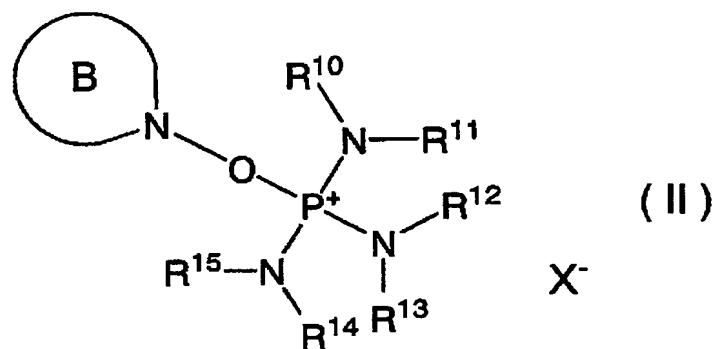
本発明者は、かかる問題点を解決する為に銳意研究を進めたところ、非プロトン性極性溶媒中で、特定の縮合剤を用い、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸のカルボキシル基に置換基をアミド結合で30モル%以上導入することにより得られた水溶性ヒアルロン酸修飾物が、従来の水溶性ヒアルロン酸修飾物では得られない実用的なレベルまでその血中滞留時間を延長できることを見出し、本発明を完成させた。

【0013】

本発明の1つの側面によれば、非プロトン性極性溶媒中で、式(II)：

【0014】

【化1】



【0015】

[式中、R<sup>10</sup>、R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>13</sup>、R<sup>14</sup>およびR<sup>15</sup>は、それぞれ独立にC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル基から選択され、またはR<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>およびR<sup>13</sup>、ならびにR<sup>14</sup>およびR<sup>15</sup>は、それらが結合する窒素原子と一緒にになって含窒素ヘテロ環を形成してもよく、環Bは単環式または縮環式の含窒素ヘテロ環基であり、X<sup>-</sup>はアニオンを表す]

で表される縮合剤を使用して、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸部分に含まれるカルボキシル基を、30モル%以上の修飾率で置換アミド基に変換する工程を含む、水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法が提供される。

【0016】

本発明の1つの実施態様において、カルボキシル基の変換により生じる置換アミド基の置換基は、少なくとの1以上の官能基を含む。当該官能基は、例えば、置換されていてよいアミノ基、ヒドロキシル基、メルカプト基、カルボキシル基、アルデヒド基、メタクリロイル基、およびアクリロイル基であってもよく、好ましくは、置換されていてよいアミノ基である。ここで、当該官能基の数は、例えば1~3個、好ましくは1個である。

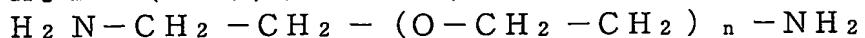
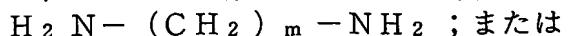
【0017】

本発明の別の側面によれば、非プロトン性極性溶媒中で、上記式(II)で表される縮合剤を使用して、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸部分に含まれるカルボキ

シル基を30モル%以上の修飾率で置換アミド基に変換する工程を含む、水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法であって、カルボキシル基の変換により生じる置換アミド基の置換基が、アミノアルキル基またはアミノ（ポリアルキレンオキシ）基である、前記製造方法もまた提供される。

## 【0018】

本発明の1つの実施態様において、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法において、ヒアルロン酸またはその誘導体と反応させる化合物は、式：



[式中、mは2～10から選択される整数であり、nは1～10から選択される整数である]

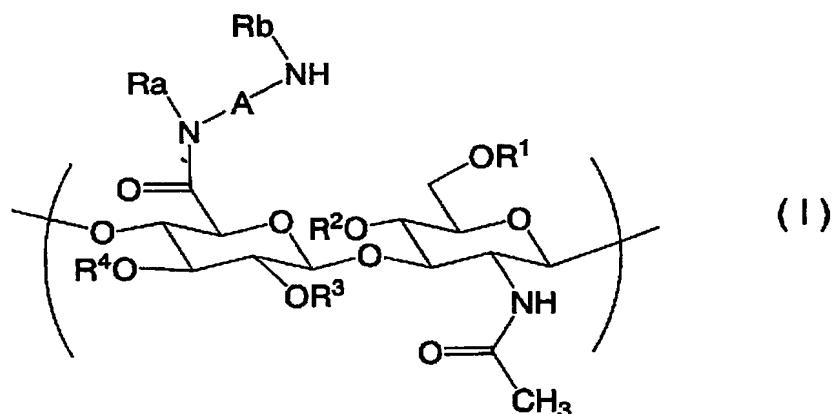
で表される。

## 【0019】

本発明のさらに別の側面によれば、非プロトン性極性溶媒中で、上記式（II）で表される縮合剤を使用して、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸部分に含まれるカルボキシル基を30モル%以上の修飾率で置換アミド基に変換する工程を含む、水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法であって、前記水溶性ヒアルロン酸修飾物が式（I）：

## 【0020】

## 【化2】



## 【0021】

[式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、それぞれ独立に、水素原子、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル基またはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルカルボニル基から選択され、

RaおよびRbは、それぞれ独立に、水素原子またはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル基から選択され、

Aは、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-または-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-であり

mは2～10から選択される整数であり、nは1～10から選択される整数である]で表される繰り返し単位を分子内に少なくとも1以上含むものである、前記製造方法もまた提供される。

## 【0022】

本発明の1つの実施態様において、前記水溶性ヒアルロン酸修飾物が薬物担体として使用されうる。また、前記水溶性ヒアルロン酸修飾物は、ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有しうるものであり、例えば、前記水溶性ヒアルロン酸誘導体の哺乳動物における平均血中滞留時間が、例えば18時間以上である。

## 【0023】

本発明の製造方法において、好適な非プロトン性極性溶媒には、例えば、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルアセトアミド（DMAc）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン（DMI）、スルホラン（SF）、N

一メチルピロリドン（NMP）またはこれらの2種以上の混合溶媒などが含まれ、具体的には、ジメチルスルホキシド（DMSO）である。また、式（II）において、環Bは、例えば、ベンゾトリアゾールー1ーイルであり、前記縮合剤には、例えば、ベンゾトリアゾールー1ーイルオキシートリス（ジメチルアミノ）ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート（BOP）、ベンゾトリアゾールー1ーイルオキシートリス（ピロリジノ）ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート（PyBOP）、およびこれらの混合物から選択されるBOP系縮合剤が含まれる。

#### 【0024】

本発明の別の側面によれば、上記の製造方法により得られる水溶性ヒアルロン酸修飾物が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む薬物担体が提供される。本発明の1つの実施態様において、当該薬物担体は、水溶性ヒアルロン酸修飾物により表面修飾された微粒子薬物担体である。

#### 【0025】

本発明のさらに別の側面によれば、前記水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む医薬組成物が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、前記水溶性ヒアルロン酸修飾物と薬物とからなる水溶性ヒアルロン酸修飾物ー薬物コンジュゲートが提供される。

#### 【0026】

本発明のさらに別の側面によれば、水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む、治療用あるいは診断用の医療用デバイスが提供される。本発明の1つの実施態様において、当該医療用デバイスは、水溶性ヒアルロン酸修飾物で表面修飾を施した医療用デバイスである。

#### 【発明の実施の形態】

#### 【0027】

以下、本発明を更に具体的に説明する。

本発明は、非プロトン性極性溶媒中で、特定の縮合剤を用い、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸のカルボキシル基に置換基をアミド結合で30モル%以上導入する、水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法、並びに該製造方法により得られた水溶性ヒアルロン酸修飾物に関する。

#### 【0028】

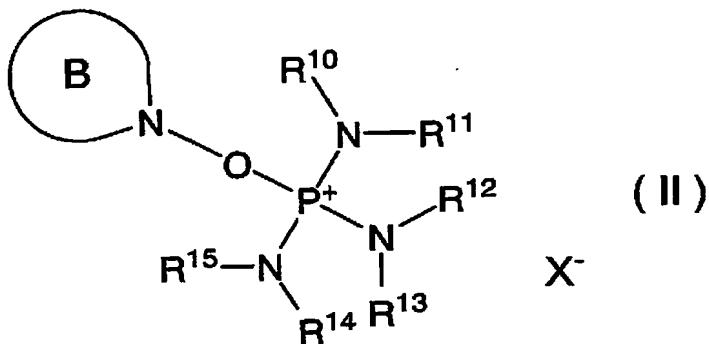
溶媒は極性有機溶媒でなければならず、特に非プロトン性極性溶媒が好ましい。非プロトン性極性溶媒と水との混合溶媒、あるいは、水を溶媒に使用した場合には、何れの縮合剤を用いても実用上十分な血中滞留性を付与するために必要な高い導入率が得られない。使用可能な非プロトン性極性溶媒は、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルアセトアミド（DMAc）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン（DMI）、スルホラン（SF）、N-メチルピロリドン（NMP）またはそれらの2種以上の混合溶媒等が挙げられる。好ましくは、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、N-メチルピロリドンまたはそれらの2種以上の混合溶媒であり、特に好ましくは、ジメチルスルホキシドである。

#### 【0029】

本発明の製造方法には、式（II）：

#### 【0030】

## 【化3】



## 【0031】

[式中、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{15}$ 、環Bおよび $X^-$ は、既に定義したとおりである]

で示される縮合剤が用いられる。ここで、環Bは、酸性プロトンを有さない含窒素ヘテロ環基であれば特に限定されず、 $C_1-C_6$ アルキル基またはハロゲン原子などの置換基により置換されていてもよい。環Bには、例えばピロリジン-2, 5-ジオン-1-イル、3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン、ベンゾトリアゾール-1-イルなどが含まれる。 $X^-$ には、例えばフッ化物イオン、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオンなどのハロゲン化物イオン、 $CF_3SO_3^-$ 、 $BF_4^-$ 、 $PF_6^-$ などが含まれる。

## 【0032】

$R^{10}$ および $R^{11}$ 、 $R^{12}$ および $R^{13}$ 、ならびに $R^{14}$ および $R^{15}$ が、それらが結合する窒素原子と一緒にになって含窒素ヘテロ環としては、5~7員飽和含窒素ヘテロ環などが好ましく、具体的にはピロリジン、ピペリジン、ホモピペリジンなどが含まれる。

## 【0033】

好ましくは当該縮合剤は、環Bがベンゾトリアゾール-1-イルであるBOP系縮合剤である。好ましいBOP系縮合剤としては、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシートリス(ジメチルアミノ)ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート(以下、BOPとも称す)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシートリス(ピロリジノ)ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート(以下、PyBOPとも称す)、およびこれらの混合物が挙げられる。BOP系縮合剤は単独または適宜組み合わせて利用することができる。

## 【0034】

なお、上記以外の他の縮合剤、例えば $N, N'$ -カルボジイミダゾール(以下、CDIとも称す)、 $N, N'$ -ジシクロヘキシカルボジイミド(以下、DCCとも称す)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(以下、EDCとも称す)、 $EDC/3$ 、4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(以下、HODhb<sub>t</sub>とも称す)、 $N$ -エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン(以下、EEDQとも称す)、4-(4, 6-ジメトキシdimethoxy-1, 3, 5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリウムクロリド-n-水和物(以下、DMT-MMとも称す)、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム テトラフルオロボレート(以下、TB TUとも称す)等では、実用上十分な血中滞留性(例えば平均血中滞留時間(以下、MRTとも称す)で18時間以上)を有するヒアルロン酸修飾物は得られず、またはヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を付与するために必要な高い導入率が得られない。さらに、CDIを用いた場合は、縮合反応中にHA分子量が低下してしまうため実用的ではない。

## 【0035】

本発明に用いられるヒアルロン酸(HA)はHA骨格を有していれば特に限定されず、HAの一部を誘導体化したHA誘導体や、HA及びHA誘導体の塩(ナトリウム塩、カリ

ウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、アルミニウム塩、等)なども含まれる。本発明に用いられるHAは、どのようにして得られたHAでもよく、動物組織から抽出されたHA、発酵法で得られたHA、化学合成で得られたHAなど、その由来は限定されない。また、HAを有機溶媒に可溶化する為に、テトラブチルアンモニウム塩等の疎水性の高い対イオンにイオン交換したものを用いてもよい。

## 【0036】

本発明の水溶性HA修飾物において、置換アミド基に変換されているカルボキシル基の割合は、カルボキシル基修飾率として以下の式：

## 【0037】

## 【化4】

$$(カルボキシル基修飾率) = \frac{(各分子中の修飾されたカルボキシル基の合計数)}{(各分子中のグルクロン酸の合計数)} \times 100$$

## 【0038】

により算出される。実用的な血中滞留時間を得るために、本発明の水溶性HA修飾物のカルボキシル基修飾率は30%以上であることが好ましく、50%以上であることがさらに好ましい。修飾率が100%に近づく程、HAとしての特性が実質上失われ、本発明の長所が活かされなくなることから、最大修飾率は90%程度が好ましい。例えば当該HA修飾物の修飾率は、30%~90%、より具体的には50%~80%である。

## 【0039】

ここで、カルボキシル基の修飾率は、プロトンNMRで定量することができる。具体的には、プロトンNMRで得られるアミノ化(以下、AM化とも称す)されたHA誘導体中のアミノ化合物の量と、HA由来のピークとの比較から求めることができる。例えば、エチレンジアミン(以下、EDAとも称す)でアミノ基を導入したヒアルロン酸誘導体(以下、HA-AMとも称す)のプロトンNMRから得られるアミン化合物由来のピーク(2.9~3.1 ppm:測定溶媒D<sub>2</sub>O)と、HA由来のピーク(1.8~1.9 ppm:測定溶媒D<sub>2</sub>O)の比を実測する。

## 【0040】

また、本発明の水溶性HA修飾物の分子量も、その体内動態を左右する。本発明の水溶性HA修飾物の血中滞留時間はHAの分子量にも依存し、分子量の大きなHA程その血中滞留時間は長い。従って、水溶性HA修飾物の分子量と水溶性HA修飾物のカルボキシル基の修飾率を変化させることで、水溶性HA修飾物の血中滞留時間を制御することが可能である。本発明に用いられる原料HAの分子量は特に制限されないが、余りに低分子量では得られた水溶性HA修飾物の血中滞留時間が短くなる。逆に、余りに高分子量になると得られた水溶性HA修飾物の粘度が非常に高くなり、高濃度での投与が難しくなる。また、本発明の水溶性HA修飾物の血中滞留時間は分子量が一定以上大きくなるとほとんど変化しなくなるので、通常、原料HAの分子量は粘度平均分子量で5000ダルトン~100万ダルトンであることが好ましく、1万ダルトン~30万ダルトンであることがより好ましく、8万ダルトン~30万ダルトンであることがさらに好ましい。尚、HA重量平均分子量の測定方法については、光散乱法、粘度法等、各種の公知の方法を利用することができます。

## 【0041】

本発明の製造方法により得られる水溶性HA修飾物の血中滞留時間は、原料HAの血中滞留時間に比べて延長されているものであることが好ましい。ここで、血中滞留時間は、平均血中滞留時間(以下、MRTとも称す)、血中半減期(以下、t<sub>1/2</sub>とも称す)、血中クリアランス(C<sub>1</sub>)などの公知の代表的なパラメーターを利用して適宜比較することができる。本発明製造方法により得られる水溶性HA修飾物のヒトを含む哺乳類における血中滞留時間は、実用面から平均血中滞留時間(MRT)が18時間以上のものであることが好ましく、30時間以上のものがより好ましい。

## 【0042】

また、本発明の別の側面によれば、本発明の製造方法により得られる水溶性HA修飾物は、原料HAに比べてヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有するものであることが好ましい。ここで、「ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有する」とは、原料HAと本発明の水溶性HA修飾物をそれぞれヒアルロニダーゼにより酵素分解させた際に、原料HAよりも分解速度が遅いかまたは分解が進まない性質を有することを指す。例えば、一定時間ヒアルロニダーゼ処理した際に、原料HAでは観察される2糖分解ピークが観察されなければ「分解が進まない」性質を有する（即ち、ヒアルロニダーゼによる分解に対して耐性を有する）と判定することができる。なお、HAの分解速度や分解状態はゲル浸透クロマトグラフィー（以下、GPCとも称す）などの常法を用いて観察することができる。

#### 【0043】

本発明の水溶性HA修飾物は、特に限定はされないが、例えば10mg/mL～1000mg/mLの水に対する溶解度を有する。実際に治療を目的として投与される時のHA修飾物の濃度は10～500mg/mL程度であるので、本発明の水溶性HA修飾物の溶解度は、好ましくは、室温において生理食塩水に対して10mg/mL以上である。

#### 【0044】

HAまたはその誘導体に含まれるグルクロン酸部分のカルボキシル基を変換して導入されるアミド結合の置換基としては、当該変換後に得られるHA修飾物が水溶性であれば特に制限されない。本発明のHA修飾物が有する置換基はどのような置換基であってもよいが、得られたHA修飾物の水溶性を保持するために、親水性の置換基または疎水性の低い置換基を導入することが好ましい。

#### 【0045】

上記のアミド化の際にヒアルロン酸またはその誘導体と反応させる化合物の具体例は、一分子中に複数の官能基を持ち、その官能基のうち少なくとも一つは置換されていてもよいアミノ基である化合物である。ここで、官能基とは置換されていてもよいアミノ基、ヒドロキシル基、メルカプト基、カルボキシル基、アルデヒド基、メタクリロイル基、アクリロイル基から選択される。官能基の数は好ましくは2つである。即ちこの場合、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸のカルボキシル基にアミド結合する化合物は、2つのアミノ基をアルキルで結合させた化合物もしくは2つのアミノ基をポリアルキレンオキシ基で結合させた化合物等の2つのアミノ基を有する化合物（以下、ジアミン化合物とも称す）；アミノ基とヒドロキシル基を有する化合物；アミノ基とメルカプト基を有する化合物；アミノ酸、ペプチド等のアミノ基とカルボキシル基を有する化合物；アミノ基とアルデヒド基を有する化合物、アミノ基とメタクリロイル基を有する化合物；または、アミノ基とアクリロイル基を有する化合物から選択される。好ましくはジアミン化合物である。上記の化合物はアミノ基に置換基を有していてもよく、当該置換基には例えばC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル基などが含まれる。

#### 【0046】

特定の実施態様において、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸のカルボキシル基にアミド結合する化合物の具体例は、式 H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NH<sub>2</sub>（式中、mは2～10の整数である。）、または式 H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>（式中、nは1～10の整数である。）で表されるジアミン化合物である。

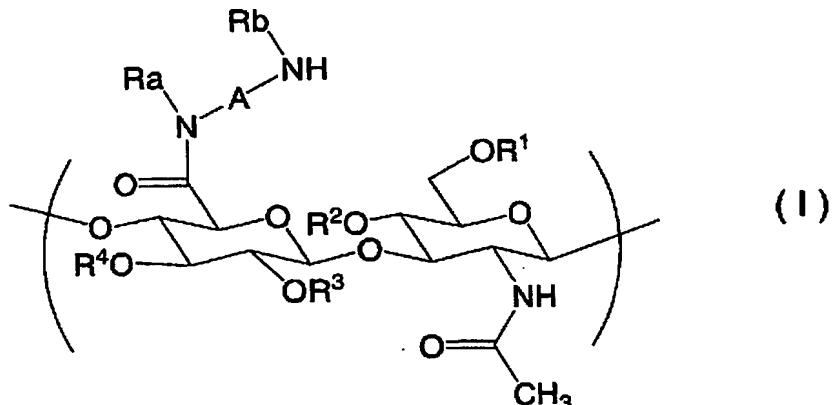
#### 【0047】

なお、これらの化合物は例えばシグマーアルドリッヂ社などから市販されており、適宜購入して利用することができる。また、常法により合成してもよい。

従って、本発明の水溶性HA修飾物は、好ましくは式(I)：

#### 【0048】

## 【化5】



## 【0049】

[式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup> およびR<sup>4</sup> は、それぞれ独立に、水素原子、C<sub>1</sub>～6 アルキル基またはC<sub>1</sub>～6 アルキルカルボニル基であり；

R<sup>a</sup> およびR<sup>b</sup> は、それぞれ独立に、水素原子またはC<sub>1</sub>～6 アルキル基であり； Aは、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-または-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-であり；

； nは、1～10の整数である]

で表される繰り返し単位を分子内に少なくとも1以上含む。

## 【0050】

本発明において「C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub> アルキル基」とは、炭素数1～6の直鎖状、分岐鎖状のアルキル基を意味し、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、i-ブチル、t-ブチルなどの「C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub> アルキル基」が含まれ、さらに、n-ペンチル、3-メチルブチル、2-メチルブチル、1-メチルブチル、1-エチルブロピル、n-ヘキシル、4-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2-メチルペンチル、1-メチルペンチル、3-エチルブチル、および2-エチルブチルなどが含まれる。

## 【0051】

本発明において「C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub> アルキルカルボニル基」とは、炭素数1～6の直鎖状、分岐鎖状のアルキル基を有するアルキルカルボニル基を意味し、例えば、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、ピバロイル、バレリル、イソバレリル、ヘキサノイルなどが含まれる。

## 【0052】

置換基の導入量は、縮合剤のHAに対する添加量および反応溶液中HA濃度で調節することができる。

また、本発明の水溶性HA修飾物の電荷に関しては、導入された置換基が、カチオン性であった場合、トータルの電荷がプラス側に振れ、血中滞留時間の短縮に繋がるため、血中滞留時間を延長する場合には修飾電荷はノニオン性か、アニオン性であることが好ましい。

## 【0053】

本発明の水溶性HA修飾物の調製方法は、例えば、テトラブチルアンモニウム(TBA)塩化したHAをDMSOに溶解し、ジアミノ系化合物を添加、HAのカルボキシル基にBOP系縮合剤で縮合させ、アミノ基を導入したHA（以下、HA-AMとも称す）を合成する。このアミノ基を修飾することで、メルカプト基、アクリロイル基、メタクリル基などの官能基を導入できる。この際、残存したアミノ基は、例えば無水コハク酸等で処理、カルボキシル基に戻してトータル電荷をアニオン性にした方が血中滞留時間の延長に好ましい。あるいは、同様の方法で、アミノ酸、ペプチド等のアミノ基で修飾しても良い。また、アミノ基含有化合物で直接メルカプト基、アクリロイル基、メタクリル基等の官能基

を導入してもよい。

**【0054】**

本発明の水溶性HA修飾物は、薬物担体として用いることができる。担持される薬物は特に限定されず、低分子化合物、タンパク質、ペプチド等を用いることが可能である。また、薬物を担持させるにおいては、公知の各種の方法を用いることができ、薬物を本発明の水溶性HA修飾物中に封入してもよく、薬物と本発明の水溶性HA修飾物とをコンジュゲートにしてもよい。

**【0055】**

本発明の水溶性HA修飾物と薬物とからなるコンジュゲートの調製方法は、既知のポリマーとタンパク質のコンジュゲートで使用されている方法を用いることができる。例えば、上述のアミノ基修飾されたHAを合成、この一部をN-スクシンイミジル 3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート (N-Succinimidyl 3-[2-pyridyl dithio] propionate; SPDP) と反応させ、メルカプト基を導入したHA (HA-SH) を調製する。この際、余剰のアミノ基は、例えば無水コハク酸等で処理、カルボキシル基に戻してトータル電荷をアニオン性にした方が好ましい。一方で、タンパク質にマレイミド基、ビニルスルホン基などのメルカプト基と特異的に反応する官能基を導入する。これをHA-SHと反応させコンジュゲートを調製すればよい。また、逆に、例えば、マレイミドブチリロキシスルホサクシンイミドでHAのアミノ基にマレイミド基を導入し、メルカプト基含有タンパク質またはペプチド等の薬物と反応させコンジュゲートを調製してもよい。あるいは、アミノ基修飾されたHAにN-ヒドロキシサクシンイミド (NHS) 基を導入し、薬物のアミノ基とコンジュゲートしても良い。

**【0056】**

ここで、このコンジュゲートにおいて、コンジュゲートの生物活性を有効に保つために、タンパク質と水溶性HA修飾物主鎖間のスペーサーの長さを調節したり、部位特異的なコンジュゲートとすることもできる。

**【0057】**

また、本発明の水溶性HA修飾物は薬物とのコンジュゲート以外にも、高分子ミセル、リポソーム、ナノ微粒子等の微粒子性薬物キャリアーにおいて、そのステルス化のための表面修飾に用いることもできる。ここで「表面修飾」とは他の合成高分子、天然高分子、脂質、金属、セラミックスあるいはそれらの複合体などからなる物質の表面に、本発明の水溶性HA修飾物を化学的に結合または物理的に吸着させ、当該物質の最表面に本発明の水溶性HA修飾体が存在している状態を指す。例えば、本発明の水溶性HA修飾物とPLGA等の疎水性高分子を結合させた化合物を含む高分子ミセルや、本発明の水溶性HA修飾物をリン脂質に結合させたリポソーム、あるいは、本発明の水溶性HA修飾物に疎水性分子を結合させ、疎水性相互作用で疎水性微粒子表面をコートした微粒子等が挙げられる。

**【0058】**

本発明における「微粒子薬物担体」とは、疾患の治療または診断のために用いられる微粒子状の薬物担体をいう。当該担体の粒径は特に限定はされないが、例えば1nm～200μmである。

**【0059】**

また、本発明の水溶性HA修飾物自体を、多価官能性化合物を架橋剤に用いてゲル化させ生理活性物質を内包した薬物担体、あるいは外科手術後の癒着防止剤などの医療用デバイスの成分とすることもできる。本発明における「医療用デバイス」とは、疾患の治療または診断、あるいはそれらの補助に用いられるデバイスであれば特に限定されず、例えば人工臓器、インプラント、カテーテル、薬物内包ゲル、薬物内包ペレットなどが含まれる。

**【0060】**

なお、前述の薬剤（低分子化合物、タンパク質、ペプチド）の例としては、以下のものを挙げることができる。

低分子化合物の例としては、例えば、制癌剤（例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アルカロイド等）、免疫抑制剤、抗炎症剤（ステロイド剤、非ステロイド系抗炎症剤、等）、抗リウマチ剤、抗菌剤（ $\beta$ -ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、新キノロン系抗生物質、サルファ剤、等）などを挙げることができる。

#### 【0061】

タンパク質、ペプチドの例としては、例えば、エリスロポエチン（EPO）、グラニュロサイトコロニー刺激因子（G-CSF）、インターフェロン- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、（INF- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ）、トロンボポエチン（TPO）、シリアリーニュートロフィックファクター（CNTF）、チューマーネクローシスファクター（TNF）、チューマーネクローシスファクター結合タンパク質（TNFbp）、インターロイキン-10（IL-10）、FMS類似チロシンカイネース（F1t-3）、成長ホルモン（GH）、インシュリン、インシュリン類似成長因子-1（IGF-1）、血小板由来成長因子（PDGF）、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト（IL-1ra）、ブレイン由来ニューロトロフィックファクター（BDNF）、ケラチノサイト成長因子（KGF）、幹細胞因子（SCF）、メガカリオサイト成長分化因子（MGDF）、オステオプロテゲリン（OPG）、レプチニン、副甲状腺ホルモン（PTH）、塩基性フィプロプラスト成長因子（b-FGF）、骨形成タンパク質（BMP）、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、C型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）、抗体、ダイアボディー、ミニボディー、断片化抗体等を挙げることができる。

#### [発明の効果]

#### 【0062】

本発明により、従来の方法では得られない、実用的なレベルまで血中滞留時間が延長された水溶性HA修飾物を製造することが可能となる。さらに本発明により提供される水溶性HA修飾物を担体に用い、薬物をコンジュゲート化することで、従来の技術では達成できなかった、実用的でかつ安全な医薬組成物を提供することが可能である。

#### 【実施例】

#### 【0063】

以下、本発明の好適な実施例についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

##### 〔実施例1〕 非プロトン性極性溶媒中のヒアルロン酸修飾物の合成（縮合剤、溶媒混合比率、酵素分解性）

###### （実施例1-1）

分子量 $2.0 \times 10^5$ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウム（HA）（電気化学工業株式会社製）をテトラブチルハイドロオキサイド（シグマーアルドリッヂ社）でテトラブチルアンモニウム（TBA）塩化したDOWEX 50WX8-400（シグマーアルドリッヂ社）を用いてTBA塩化し、テトラブチルアンモニウム塩化ヒアルロン酸（HA-TBA）29.1mgを2.0mg/mL濃度となるようDMSO（和光純薬株式会社）に溶解した。HA unit/BOP（和光純薬株式会社）/エチレンジアミン（EDA）（シグマーアルドリッヂ社）=1/2.5/100（mol/mol/mol）の当量比でEDA、BOPの順で添加し、室温下で一晩反応させた。その後1M NaCl水溶液を10mL加えた後、5N HClを加えてpHを3まで低下させ、さらに2N NaOHにて中和を行った。大過剰量の水に対して透析精製し（スペクトラポア7、分画分子量（MWCO）：12k-14kダルトン）、限外ろ過後、凍結乾燥して標題のアミノ基が導入されたヒアルロン酸（HA-AM）25.8mgを得た。

###### （実施例1-2）

エチレンジアミンの代わりに2,2'-(エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン)（EDOBEA）（シグマーアルドリッヂ社）を用い、HA-TBA 35.1mgを用い、HA unit/BOP/EDOBEA=1/2.5/50（mol/mol/mol）

) の当量比で反応させたこと以外は実施例1-1と同様の方法で行い、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 27.2mgを得た。

(実施例1-3)

EDOBEAの代わりにヘキサメチレンジアミン(HMDA)(シグマーアルドリッヂ社)を用い、HA-TBA 62.0mgを用いたこと以外は実施例1-2と同様の方法で行い、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 41.1mgを得た。

(実施例1-4)

BOPの代わりにPyBOP(国産化学株式会社)を用い、HA-TBA 51.8mgを用いたこと以外は実施例1-2と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 39.0mgを得た。

(比較例1-1)

DMSOの代わりに水を用い、BOPの代わりにEDC(シグマーアルドリッヂ社)を用い、50.0mgのHA(ナトリウム塩)を1.0mg/mL濃度とし、HA unit/EDC/Ethylene diamine 2HCl(EDA·2HCl)(和光純薬株式会社)=1/4/100(mol/mol/mol)の当量比にした。pHは7.0に調整し一晩反応させた。それ以外は実施例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 36.1mgを得た。

(比較例1-2)

DMSOの代わりに水/エタノール(90/10)を用いたこと以外は比較例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 36.0mgを得た。

(比較例1-3)

DMSOの代わりに水/エタノール(70/30)を用いたこと以外は比較例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 38.3mgを得た。

(比較例1-4)

EDCの代わりにEDC/HODhb(渡辺化学工業株式会社)を用い、HA unit/EDC/HODhb/EDA·2HCl=1/4/4/100(mol/mol/mol/mol)の当量比にしたこと以外は比較例1-3と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 49.3mgを得た。

(比較例1-5)

DMSOの代わりに水/DMSO(60/40)を用い、HA unit/EDC/EDA·2HCl=1/2/50(mol/mol/mol)の当量比にしたこと以外は比較例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 44.0mgを得た。

(比較例1-6)

EDCの代わりにBOPを用いたこと以外は比較例1-5と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 42.1mgを得た。

(比較例1-7)

EDA·2HClの代わりにヘキサメチレンジアミン 2HCl(HMDA·2HCl)(東京化成工業株式会社) HMDA·2HClを用いたこと以外は比較例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 35.2mgを得た。

(比較例1-8)

EDA·2HClの代わりにHMDA·2HClを用いたこと以外は比較例1-3と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 33.3mgを得た。

(比較例1-9)

EDA·2HClの代わりにHMDA·2HClを用い、水/エタノール(60/40)を用いたこと以外は比較例1-3と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 33.6mgを得た。

(比較例1-10)

EDA·2HClの代わりにHMDA·2HClを用い、水/エタノール(60/40)を用いたこと以外は比較例1-4と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸

(HA-AM) 48.4 mgを得た。

(比較例1-11)

水/DMSO(60/40)の代わりに水/DMSO(50/50)を用い、51.9 mgのHAを用いたこと以外は比較例1-5と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 47.5 mgを得た。

(比較例1-12)

BOPの代わりにDCC(和光純薬株式会社)を用い、69.9 mgのHA-TBAを4.0 mg/mL濃度とし、HA unit/DCC/EDOBEA=1/4/100(mol/mol/mol)の当量比にしたこと以外は実施例1-2と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 54.5 mgを得た。

(比較例1-13)

BOPの代わりにDCCを用い、54.1 mgのHA-TBAを用いたこと以外は実施例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 40.7 mgを得た。

(比較例1-14)

BOPの代わりにCDI(シグマーアルドリッヂ社)を用い、50.0 mgのHA-TBAを用いたこと以外は実施例1-1と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 31.6 mgを得た。

(比較例1-15)

BOPの代わりにEDCを用い、46.4 mgのHA-TBAを用いたこと以外は実施例1-2と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 30.4 mgを得た。

(比較例1-16)

BOPの代わりにEEDQ(和光純薬株式会社)を用い、58.4 mgのHA-TBAを用いたこと以外は実施例1-2と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 39.5 mgを得た。

(比較例1-17)

EEDQの代わりにDMT-MM(和光純薬株式会社)を用い、53.5 mgのHA-TBAを用いたこと以外は実施例1-2と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 33.2 mgを得た。

(比較例1-18)

DMT-MMの代わりにTBTU(和光純薬株式会社)を用い56.0 mgのHA-TBAを用いたこと以外は実施例1-2と同様の方法で、アミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM) 30.0 mgを得た。

(試験例1) 酵素分解性評価

実施例1-1～1-4および比較例1-1～1-18で得られたHA-AMを2 mg/mL濃度に水に溶解した。この溶液55 μLに0.2Mリン酸緩衝液(pH 6.2)132 μLおよび水77 μLを加え、ヒアルロニダーゼSD(生化学工業株式会社製)1 U/mL溶液(0.01%BSAを含む0.05Mリン酸緩衝液(pH 6.2))44 μLを加えて37℃で24時間インキュベートした。各サンプル100 μLを分取し、50 mM酢酸溶液を720 μL加え反応を停止させた。対照として酵素非添加群も同様に行なった(データ省略)。それぞれゲル浸透クロマトグラフィー(以下、GPCとも称す)に供してHA-AMの分子量の変化、分解産物の生成パターンを観察した(232 nmの吸収)。GPCの条件を以下に示す。

#### 【0064】

GPC Column: Superdex 200 10/300 GL、Superdex 75 HR 10/30、Superdex Peptide HR 10/30(アマシャムバイオサイエンス株式会社製)(3本連結)

Eluent: PBS (pH 7.4)

Flow Rate: 0.4 mL/min

Injection Volume: 50  $\mu$ L

Detection: UV (232 nm)

2糖分解ピーク（130分）が観察されたものを×、観察されなかったものを○で評価し、表1に示す。また、典型的なGPCデータを図1および図2に示す（実施例1-1～1-4、比較例1-3、1-5、1-6、1-14、参考例）。

#### 【0065】

また、実施例1-1～1-4のアミノ基導入率をプロトンNMR法で定量した（H A: N-アセチル基のメチルプロトン、1.8～1.9 ppm、AM:エチレンジアミン部分のメチレンプロトン、2.9～3.1 ppm）。プロトンNMRデータを図3に示す。アミノ基導入率はそれぞれ97.5、75.5、88.3、84.5%だった。NMRの測定条件を以下に示す。

#### 【0066】

Data point: 16384

Spectral width (X sweep) : 15 ppm

Acquisition time (X acq time) : 1.749 s

Pulse delay (Relaxation delay) : 30 s

Transients (Scans) : 64

温度：室温

測定溶媒：D<sub>2</sub>O

なお、CDIを用いた導入（比較例1-14）における、反応前後でのゲル浸透クロマトグラムを図4に示す。縮合剤としてCDIを用いた場合、明らかな分解が観察され、HAへのアミノ化合物の導入には向きであることが明らかとなった。

#### 【0067】

【表1】

| 置換基       | 溶媒                    | 締合剤         | 有機溶媒<br>% | HA濃度<br>mg/mL | HydaseSD<br>アッセイ | HA：締合剤 | HA：置換基        |
|-----------|-----------------------|-------------|-----------|---------------|------------------|--------|---------------|
| EDA 2HCl  | H <sub>2</sub> O      | EDC         | 0%        | 1mg/mL        | X                | 1:4    | 1:100 比較例1-1  |
|           | H <sub>2</sub> O/EtOH | EDC         | 10%       | 1mg/mL        | X                | 1:4    | 1:100 比較例1-2  |
|           | H <sub>2</sub> O/EtOH | EDC         | 30%       | 1mg/mL        | X                | 1:4    | 1:100 比較例1-3  |
|           | H <sub>2</sub> O/EtOH | EDC/HDDabit | 30%       | 1mg/mL        | X                | 1:4:4  | 1:100 比較例1-4  |
|           | H <sub>2</sub> O/DMSO | EDC         | 40%       | 1mg/mL        | X                | 1:2    | 1:50 比較例1-5   |
|           | H <sub>2</sub> O/DMSO | BOP         | 40%       | 1mg/mL        | X                | 1:2    | 1:50 比較例1-6   |
| EDA       | DMSO                  | DCC         | -         | 2mg/mL        | X                | 1:2.5  | 1:100 比較例1-13 |
|           | DMSO                  | CDI         | -         | 2mg/mL        | X                | 1:1.2  | 1:50 比較例1-14  |
|           | DMSO                  | BOP         | -         | 2mg/mL        | ○                | 1:2.5  | 1:100 實施例1-1  |
|           | DMSO                  | EDC         | -         | 2mg/mL        | X                | 1:2.5  | 1:50 比較例1-15  |
|           | DMSO                  | EDHQ        | -         | 2mg/mL        | X                | 1:2.5  | 1:50 比較例1-16  |
|           | DMSO                  | DMT-MM      | -         | 2mg/mL        | X                | 1:2.5  | 1:50 比較例1-17  |
|           | DMSO                  | TUTB        | -         | 2mg/mL        | X                | 1:2.5  | 1:50 比較例1-18  |
|           | DMSO                  | PyBOP       | -         | 2mg/mL        | ○                | 1:2.5  | 1:50 實施例1-4   |
| HADA 2HCl | H <sub>2</sub> O      | EDC         | 0%        | 1mg/mL        | X                | 1:4    | 1:100 比較例1-7  |
|           | H <sub>2</sub> O/EtOH | EDC         | 30%       | 1mg/mL        | X                | 1:4    | 1:100 比較例1-8  |
|           | H <sub>2</sub> O/EtOH | EDC         | 40%       | 1mg/mL        | X                | 1:4    | 1:100 比較例1-9  |
|           | H <sub>2</sub> O/EtOH | EDC/HDDabit | 40%       | 1mg/mL        | X                | 1:4:4  | 1:100 比較例1-10 |
|           | H <sub>2</sub> O/DMSO | EDC         | 50%       | 1mg/mL        | X                | 1:2    | 1:50 比較例1-11  |
| EDBREA    | DMSO                  | BOP         | -         | 2mg/mL        | ○                | 1:2.5  | 1:50 實施例1-3   |
| EDBREA    | DMSO                  | BOP         | -         | 2mg/mL        | ○                | 1:2.5  | 1:50 實施例1-2   |
|           | DMSO                  | DCC         | -         | 4mg/mL        | X                | 1:4    | 1:100 比較例1-12 |

表1

## 【0068】

〔実施例2〕 BOPの添加率によるジアミン化合物の導入率制御

HA (200kDa) - TBAそれぞれ約50mgを2.0mg/mLにDMSOに溶解し、HA unit / エチレンジアミン = 1/50 (mol/mol) の当量比で固定し、BOP試薬はHA unitに対し、1.08、1.5または2.0の当量比で一晩反応させた。その後1M NaCl水溶液を10mL加えた後、5N HClにてpHを3まで低下させた後、2N NaOHにて中和を行った。その後大過剰量の水に対して透析精製し、限外ろ過後、凍結乾燥を行った。

## 【0069】

また、HA (20kDa) - TBAそれぞれ約50mgを2.0mg/mLにDMSOに溶解し、HA unit / エチレンジアミン = 1/50 (mol/mol) の当量比で固定し、BOP試薬はHA unitに対し、1.0、1.5または2.0の当量比で一晩反応させた。その後1M NaCl水溶液を10mL加えた後、5N HClにてpHを3まで低下させた後、2N NaOHにて中和を行った。その後大過剰量の超純水 (

Q水) に対して透析精製し、限外ろ過後、凍結乾燥を行った。

#### 【0070】

実施例2のアミノ基導入率をプロトンNMR法で定量した(HA:N-アセチル基のメチルプロトン、1.8~1.9ppm、AM:エチレンジアミン部分のメチレンプロトン、2.9~3.1ppm)。プロトンNMRデータを図3に示す。アミノ基導入率を表2に示す。アミノ基の導入率はBOPの仕込みで制御可能であることが分かった。

#### 【0071】

##### 【表2】

表2

| 置換基    | HA分子量  | 反応時間       | HydaseSD<br>アッセイ | HA:結合剤    | 導入率(%)<br>(NMR) |
|--------|--------|------------|------------------|-----------|-----------------|
| EDA    | 200kDa | over night | ○                | 100:107.8 | 68              |
|        | 200kDa | over night | ○                | 100:150   | 84.5            |
|        | 200kDa | over night | ○                | 100:200   | 88              |
| EDOBEA | 20kDa  | 9h         | ○                | 100:100   | 58              |
|        | 20kDa  | 9h         | ○                | 100:150   | 69              |
|        | 20kDa  | 9h         | ○                | 100:200   | 71              |

#### 【0072】

HAは水中で分子内水素結合と、分子内、外の疎水性相互作用により、2次構造、3次構造を形成していることが知られており(The Biology of Hyaluronan. Chiba Foundation Symposium 143, 6-14 (1989))、均一な化学修飾が難しくなっていると考えられる。このため、水中でHAのカルボキシル基の多くを修飾しても、HAレセプターに認識されうる連続した4-6糖の未修飾ドメインが一部残存しており、ここが体内のHAレセプターに結合してしまうことで比較的短期間に血中からクリアされてしまうと予想される。

#### 【0073】

非プロトン性極性溶媒中ではHAの水素結合、疎水性相互作用が減弱されることでHAの高次構造が壊され、高次構造形成に基づくカルボキシル基周辺環境の不均一性が解消され、より均一な化学修飾が達成され、酵素耐性が得られるものと考えられる。

#### 【0074】

酵素耐性を獲得したHA誘導体は、CD44への認識も大きく低下しているため長期間の血中滞留性が得られるものと考えられる。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0075】

本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を用いることで、従来の水溶性ヒアルロン酸修飾物では得られない実用的なレベルまでその血中滞留時間を延長することが可能である。従って、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を担体に用い、薬物をコンジュゲート化すること、あるいは、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を薬物を含有した微粒子、ゲルなどの少なくとも表面近傍に局在化することするで、従来の技術では達成できなかった、実用的かつ安全な医薬組成物を提供することが可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0076】

【図1】本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物のGPCデータの一例である。

【図2】比較例の水溶性ヒアルロン酸修飾物およびヒアルロン酸のG P Cデータの一例であり、縦軸方向のスケールは図1と同一である。

【図3】本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物NMRデータの一例である。

【図4】CDIを用いた導入（比較例1-14）における、反応前後でのG P Cデータの一例である。

【図5】BOPの添加量によるジアミン化合物の導入率の制御におけるNMRデータの一例である。

【書類名】 図面  
【図 1】

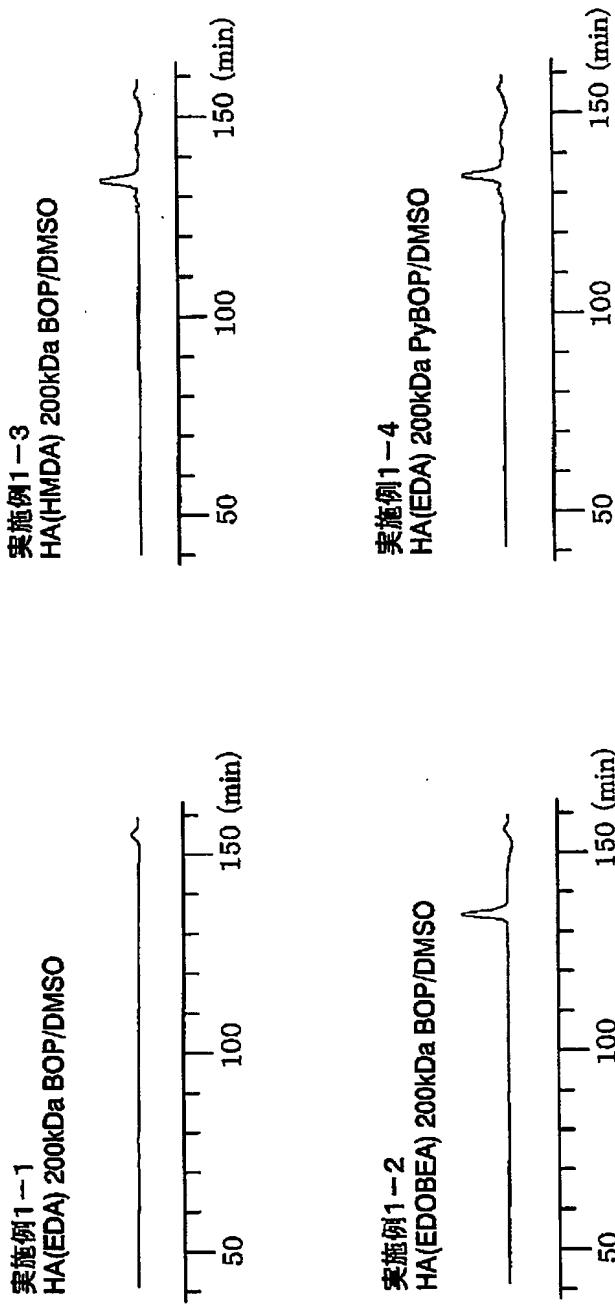


図1 (HydaseSD assay(実施例))

【図2】

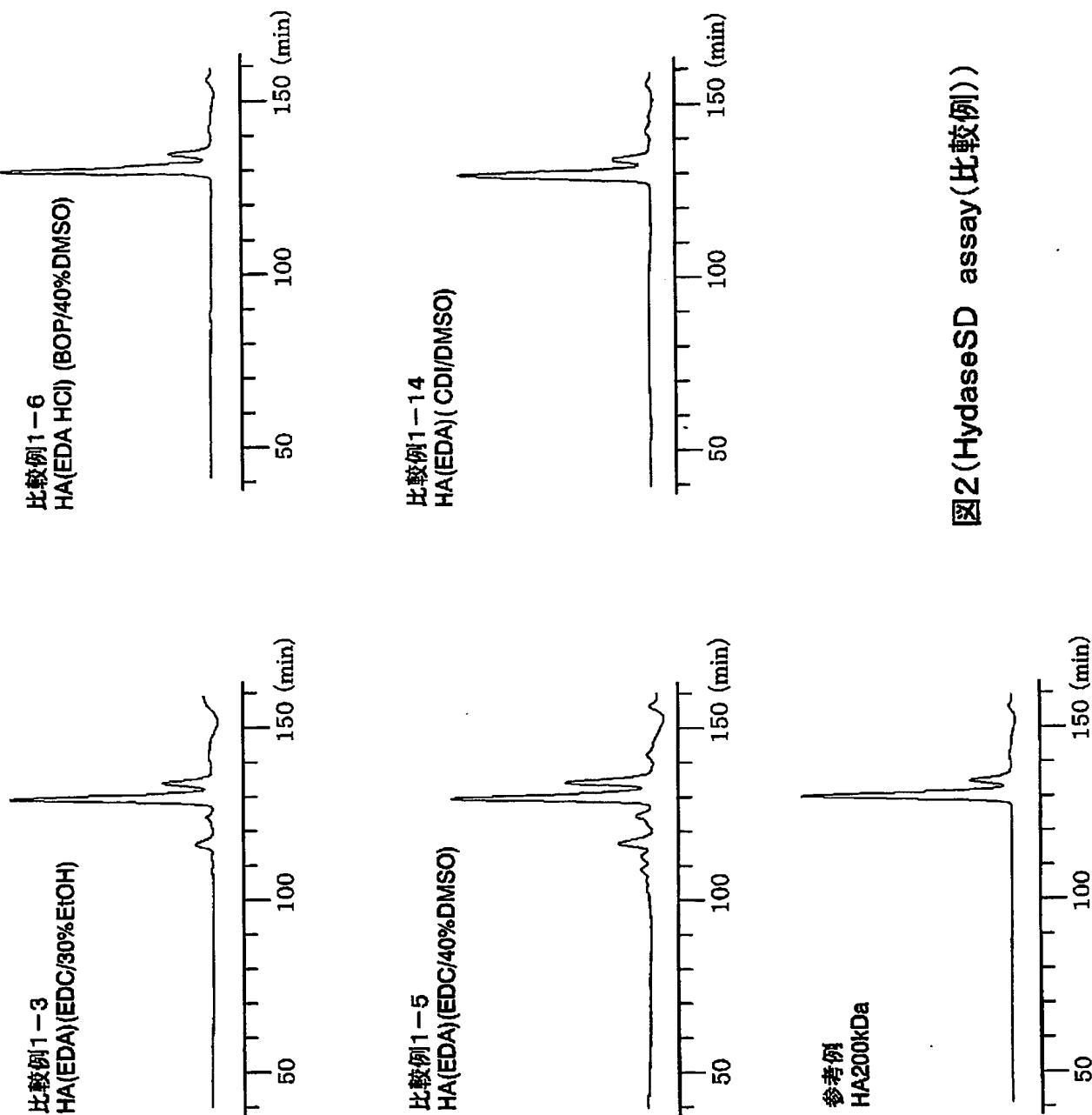
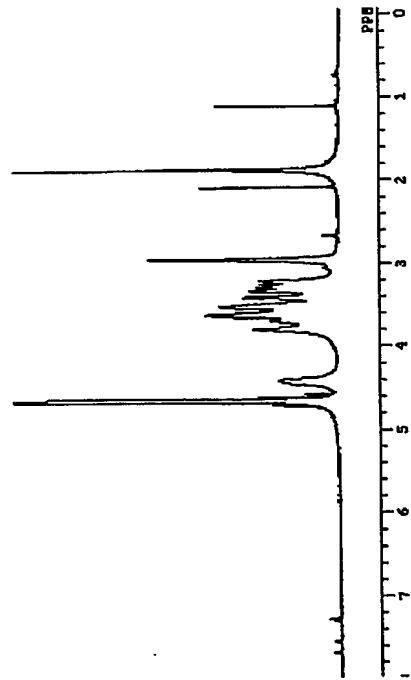


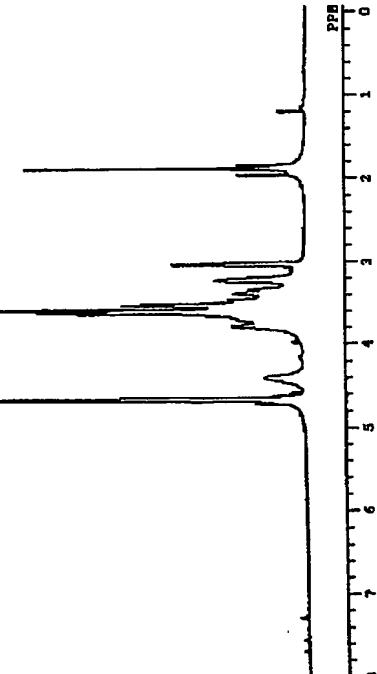
図2(HydaseSD assay(比較例))

【図3】

実施例1-1  
HA(EDA) 200kDa BOP/DMSO



実施例1-2  
HA(EDOBEA) 200kDa BOP/DMSO



実施例1-3  
HA(HMDA) 200kDa BOP/DMSO

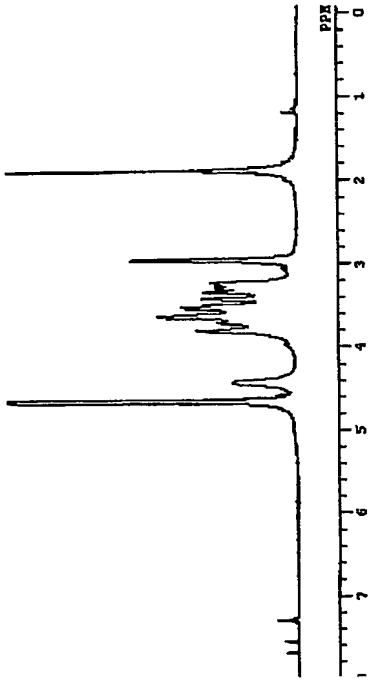
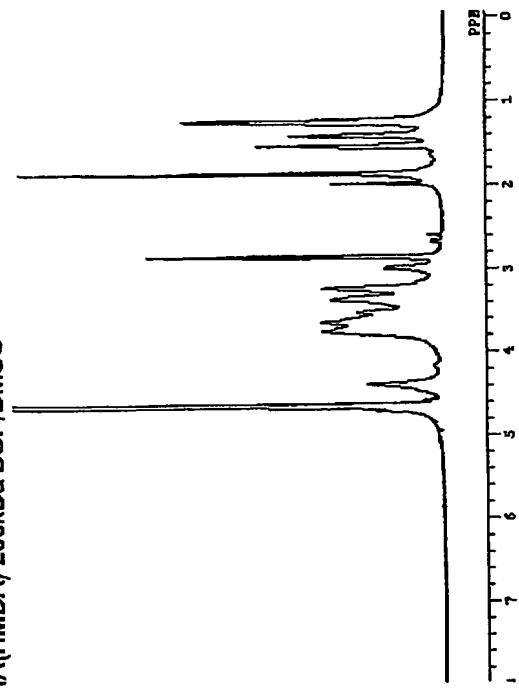
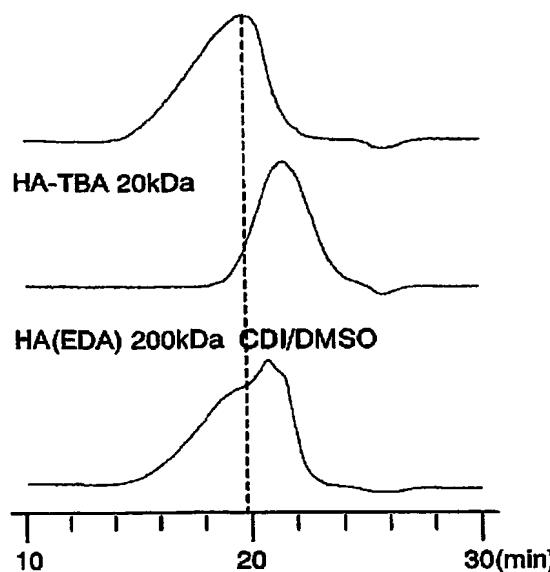


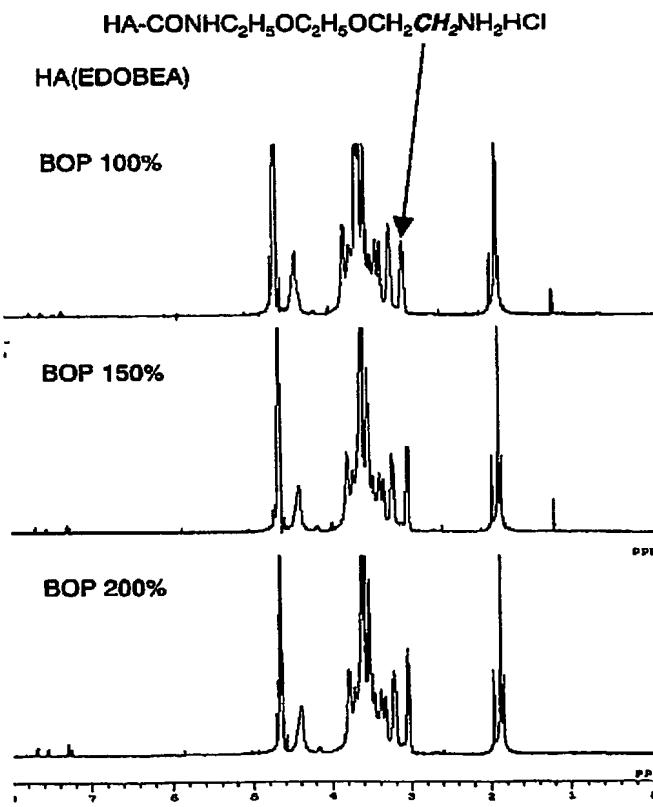
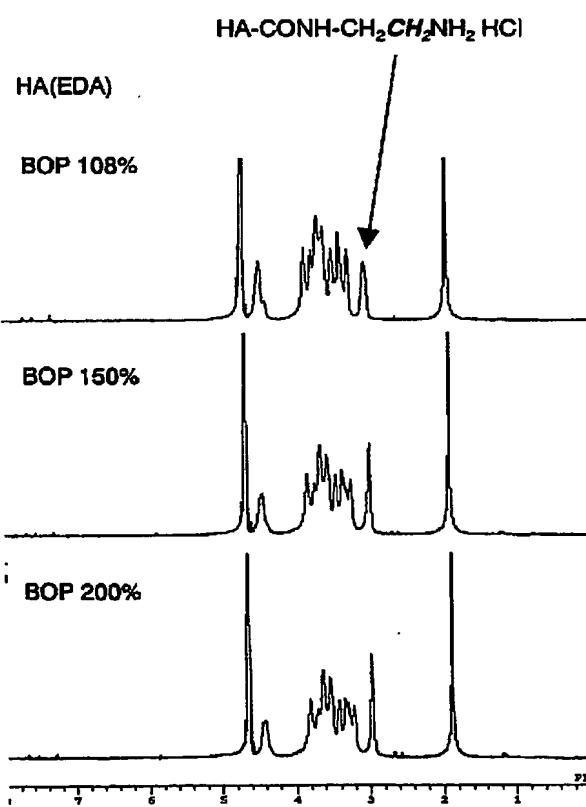
図3(NMR(実施例))

【図4】

HA-TBA 200kDa



【図5】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】

薬物担体として実用的な水溶性H A修飾物、およびその製造方法を提供する。

【解決手段】

本発明は、非プロトン性極性溶媒中で、B O P系縮合剤を用い、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸のカルボキシル基にアミド結合で置換基を30モル%以上導入することにより製造される、実用的なレベルまでその血中滞留時間を延長された水溶性ヒアルロン酸修飾物、およびその製造方法を提供する。

【選択図】なし

特願 2004-259157

出願人履歴情報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号

氏 名 中外製薬株式会社

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/JP04/016948

International filing date: 15 November 2004 (15.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-259157  
Filing date: 07 September 2004 (07.09.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 January 2005 (20.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse